

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՀՈՎԱԿԻՄՅԱՆ ԱՐՄԻՆԵ ԱՇՈՏԻ

ԱԼՑՀԵՑՄԵՐԻ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ԴԵՄ ԴԵԹ-ՊԱՏՎԱՍՏԱՆՑՈՒԹԵՐԻ
ՍՏԵՂԾՈՒՄԸ ԵՎ ԻՄՈՒՆԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ
ՓՈՐՁԱՐԿՈՒՄԸ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ՄՈԴԵԼՆԵՐԻ ՎՐԱ

Գ.00.06 - «Վիրուսաբանություն, իմունաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան – 2015

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

ОВАКИМЯН АРМИНЕ АШОТОВНА

СОЗДАНИЕ И ТЕСТИРОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ДНК-ВАКЦИН ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АЛЦГЕЙМЕРА НА МОДЕЛЯХ ЖИВОТНЫХ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.06 - «Вирусология, иммунология»

Ереван – 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԱՆ «Ա.Բ. Ալեքսանյանի անվան համաճարակաբանության, վիրուսաբանության և բժշկական մակաբուծաբանության» ԳՀԻ-ում:

Գիտական ղեկավար՝

կ.գ.դ., Տ.Կ. Դավթյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

բ.գ.դ., պրոֆ. Կ.Բ. Ենկոյան

կ.գ.թ. Դ.Ա. Պողոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ «Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ»

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2015թ. դեկտեմբերի 25-ին ժամը 14.00-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2015թ. նոյեմբերի 25-ին:

Մասնագիտական խորհրդի

գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии имени А.Б. Алексаняна МЗ РА.

Научный руководитель:

д.б.н. Т.К. Давтян

Официальные оппоненты:

д.м.н., проф. К.Б. Енкоян

к.б.н. Д.А. Погосян

Ведущая организация:

«Институт молекулярной биологии» НАН РА

Защита диссертации состоится 25 декабря 2015г. в 14:00 часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 25 ноября 2015г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется клинически прогрессирующими когнитивными нарушениями, в конечном итоге приводящими к смерти, как правило, в течение 10 лет после установления диагноза. По подсчётам ВОЗ около 47,5 млн. человек в мире живут с деменцией. Ежегодно возникает 7,7 миллиона новых случаев заболевания. Доля общего населения в возрасте 60 лет и старше с деменцией на какой-либо момент времени составляет от 5 до 8 человек на каждые 100 человек. По прогнозам, общее число людей с деменцией составит 75,6 миллиона человек в 2030 году и почти утроится к 2050 году и составит 135,5 миллиона. БА является наиболее частой причиной слабоумия – на нее приходится 60-70% всех случаев деменции. Проблема БА существует во всех странах мира, в том числе и в Армении. Статистические данные остаются наиболее изученными в США, где по состоянию на 2013 год 5,2 миллиона американцев различных возрастов имели данную болезнь [Alzheimer's Association, 2013]. Из них 5 миллионов человек 65-летнего возраста и старше и около 200000 человек моложе 65 лет с ранней формой заболевания. БА занимает 6-е место по смертности в США в целом, а в группе людей 65 лет и старше занимает 5-е место. Это единственная болезнь среди самых известных 10 в Америке, которую до сих пор не удается предотвратить, вылечить и даже замедлить её прогрессирование. Смертность от БА в США увеличилась на 71% в период между 2000 и 2015 гг., в то время как смертность от других ведущих заболеваний снизилась [National Center for Health Statistics, 2015].

Все вышеперечисленные факты говорят о крайней актуальности ведения работ по изучению БА.

БА является нейродегенеративным заболеванием, причина которого заключается в отложении аномальных бета-амилоидов ($A\beta_{42}$) с последующим образованием амилоидных бляшек [Hardy J et al., 1991]. Поэтому терапевтические мероприятия направлены на подавление накопления аномальных $A\beta$.

Одним из наиболее перспективных стратегий снижения уровня токсичных форм $A\beta$ в мозге является иммунотерапия посредством специфических антител. Первое клиническое испытание вакцины AN1792, которое было начато, основываясь на том факте, что вакцина, содержащая фибриллярную $A\beta_{42}$, предотвращает отложение $A\beta$ в трансгенной мышинной модели [Schenk D et al., 1999], было остановлено преждевременно, так как у 6% пациентов из-за активации аутореактивных Т-клеток специфических к $A\beta_{42}$ пептиду развился менингоэнцефалит [Orgogozo J et al., 2003]. Однако, важно отметить, что в этом исследовании у пациентов с высокими титрами анти- $A\beta$ антител $A\beta$ -нагрузка снизилась.

Также были проведены клинические испытания с использованием анти- $A\beta$ моноклональных антител [Pfizer/ Jenen, Eli-Lilly trials, 2008-2011]. Несмотря на то, что и эти клинические испытания потерпели неудачу, они показали, что иммунологический подход к проблеме может быть эффективен только в том случае, если будет профилактическим. Анализ данных показал статистически значимое замедление когнитивных нарушений у пациентов легкой, но не умеренной стадии БА при использовании моноклональных антител. Следует отметить, что при пассивной иммунизации необходимы частые инъекции антител в высоких дозах, которые могут привести к церебральной амилоидной ангиопатии (САА).

Последующие исследования показали, что антигенные детерминанты $A\beta_{42}$, презентруемые В- и Тh-клеткам, локализованы в разных участках пептида $A\beta_{42}$ и антитела, специфичные к N-концевой области $A\beta_{42}$ значительно снижают $A\beta$ -нагрузку в мозге

amyloid precursor protein (APP) трансгенных мышей [Ghochikyan A et al., 2009]. На основании этих данных становится особенно перспективной стратегия эпитоп-основанной вакцины, где собственный Т-клеточный эпитоп можно заменить чужеродным эпитопом [Agadjanyan M et al., 2005]. Следуя этой идее, целесообразно создание эпитоп-основанных вакцин, направленных против БА, состоящих из нескольких копий собственных В-клеточных эпитопов пептида $A\beta_{42}$, дополненных различными чужеродными Тh-клеточными эпитопами (MultiTER) традиционных вакцин или различных патогенов, с которыми человек сталкивается в течение жизни, например, эпитопы вируса гриппа. Такая стратегия может обеспечить индуцирование мощного антительного ответа, специфичного к $A\beta$ и снизить риск активации аутореактивных Т-клеток [Ghochikyan A et al., 2009].

Иммуногенная вакцина может быть основана на пептиде, рекомбинантном белке или же на ДНК, которая обеспечит *in vivo* синтез антигена. Однако, ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ по сравнению с белковыми и вирусными вакцинами. ДНК-плазмиды относительно безопасны, экономически выгодны и способны поддерживать приемлемые уровни экспрессии антигена в клетках. ДНК-вакцинами можно легко манипулировать с целью модификации генов для индуцирования нужного типа иммунной реакции. Таким образом, учитывая эти факты, в настоящее время создание ДНК-вакцины является наиболее актуальным и доступным.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось конструирование ДНК-вакцины, обладающей высокой иммуногенностью, эффективностью, безопасностью и тестирование её иммунологической эффективности на разных моделях животных.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие основные задачи:

- Конструирование ДНК-вакцины на основе универсальной MultiTER платформы (AV-1955) и проверка её экспрессии в клетках млекопитающих.
- Оценка В- и Т-клеточного иммунного ответа AV-1955 вакцины у мышей и кроликов.
- Изучение В- и Т-клеточного иммунного ответа AV-1955 вакцины у макак-резусов.
- Модифицирование AV-1955 и создание ДНК-вакцины на основе универсальной MultiTER платформы (AV-1959) с последующим тестированием её иммунологической эффективности на C57BL/6 мышах (H-2^b гаплотипа) в сравнении с AV-1955.
- Тестирование В- и Т-клеточного иммунного ответа AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 на макаках-резусах.

Научная новизна работы. Полученные в настоящей работе данные существенно дополняют сведения о В- и Т-клеточном иммунном ответе на эпитоп-основанные ДНК-вакцины против БА у мышей, кроликов и макак-резусов. В данной диссертационной работе впервые:

С помощью ПЦР были синтезированы ДНК-вакцины AV-1955 и AV-1959 на основе MultiTER платформы, состоящие из трёх копий собственных В-клеточных эпитопов пептида $A\beta_{42}$ ($A\beta_{1-11}$) и девяти/двенадцати чужеродных Тh-эпитопов соответственно.

Охарактеризован репертуар В- и Т-клеточного ответа у вакцинированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами макак-резусов, демонстрирующий индукцию антител, специфичных только к $A\beta$ и не стимулирующих В-клетки, продуцирующие антитела специфичные к чужеродным Тh-эпитопам, использованным для дизайна

MultiTER платформы, и, стимулирующий клеточный иммунный ответ специфичный к чужеродным Th-эпитолам, не распознающий собственные Т-клеточные эпитола $A\beta_{42}$, приводящие к активации аутореактивных Т-клеток.

Исследовано влияние свободной N-концевой аспарагиновой кислоты В-клеточного эпитола $A\beta_{1-11}$ на иммуногенность AV-1955 и AV-1959 вакцин у кроликов и макак-резусов.

Картированием В-клеточного ответа был выявлен самый короткий иммуногенный В-клеточный эпитол $A\beta_{42}$ пептида ($A\beta_{2-6}$).

Обнаружено, что удаление аланина из AEFRHDSGYEVH ($A\beta_{2-13}$) пептида значительно снижает аффинитет анти- $A\beta$ антител, синтезированных у мышей и макак-резусов в ответ на иммунизацию AV-1955 и AV-1959 вакцинами.

Был выявлен длительно сохраняющийся гуморальный иммунный ответ посредством характеристики продолжительности динамики иммунного ответа у макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами.

Продемонстрирован широкий индивидуальный репертуар анти-MultiTER специфичных Th-клеток у индивидуальных макак-резусов, связанный с высокой полиморфностью генов MHCII.

Научно-практическое значение работы. Экспериментальные результаты данной диссертационной работы позволяют заключить, что AV-1955 и AV-1959 вакцины, учитывая их высокую иммуногенность, эффективность и безопасность за счёт активации долговременного В-клеточного иммунного ответа, специфичного только к $A\beta_{42}$ и Т-клеточного иммунного ответа, распознающего исключительно чужеродные Th-клеточные эпитола данных вакцин, без активации аутореактивного Т-клеточного ответа к собственным Т-клеточным эпитолам $A\beta_{42}$ у мышей, кроликов и макак-резусов, имеют потенциальную возможность быть тестируемыми в клинических испытаниях.

На защиту выносятся следующие основные положения:

- Рассмотрение конструкции ДНК-вакцины на основе универсальной MultiTER платформы (AV-1955) и результатов оценки её экспрессии в клетках млекопитающих.
- Результаты иммунологической эффективности AV-1955 вакцины у кроликов в сравнении с контрольной группой, получившей p3 $A\beta_{1-11}$ -PADRE вакцину.
- Результаты иммунологической эффективности AV-1955 вакцины у макак-резусов в сравнении с контрольной группой, получившей pVAX вектор.
- Результаты оценки иммунологической эффективности AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 у мышей.
- Результаты иммунологической эффективности AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 у макак-резусов.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены на лабораторных семинарах в Institute for Molecular Medicine (IMM), Huntington Beach, CA, USA, а также представлены на расширенном заседании ученого совета в Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders at the University of California, Irvine (UCI MIND) и НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А.Б. Аляксаяна МЗ РА.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 117 страницах, содержит 30 рисунков и 2 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов и списка литературы, включающего 174 источника.

Место выполнения работы. Работа выполнена в Institute for Molecular Medicine (IMM), Huntington Beach, CA, USA в сотрудничестве с Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders at the University of California Irvine (UCI MIND) USA.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 5 печатных работах, опубликованных в научных журналах.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава посвящена обзору литературы, в котором приводятся общие характеристики и сведения о БА, включающие этиологию, факторы риска, стадии, диагностику и нейропатологические особенности заболевания. Рассматривается применение иммунотерапии и роль иммунопрофилактики при данной болезни. Обобщены сведения о разработке вакцин преведением примеров вакцин против БА, основанных на вирусных векторах, рекомбинантном белке, пептиде и ДНК.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные. *Мыши.* 6-8-и недельные чистопородные (инбредные) мыши (самки) C57BL/6 (H-2^b гаплотипа).

Кролики. Новозеландские белые кролики (самки).

Макаки-резусы. Генетически неселекционированные макаки-резусы (самцы) в возрасте от 2-х лет и 8 месяцев до 3-х лет и 9 месяцев.

2.2. Конструирование ДНК-вакцин. AV-1955 и AV-1959 конструкции были получены путём клонирования pVAX1 вектора со встроенным 3A β_{1-11} -PADRE-8Ther или 3A β_{1-11} -PADRE-11Ther фрагментом, полученным с помощью ПЦР с использованием BamHI и NheI рестрикционных сайтов. Верность последовательности синтезированной плазмиды была подтверждена методом секвенирования нуклеотидной последовательности.

2.3. Иммунопреципитация и вестерн-блоттинг. Экспрессия полученных ДНК-конструкций и секреция протеинов стандартным методом IP/WB была исследована в супернатанте временно трансфицированных CHO (Chinese hamster ovary) клеток. Протены, из кондиционированной среды (К.с.) иммуноприцепитированы и визуализированы с использованием 6E10 моноклональных антител (Covance), специфичных к 3-8 а.к. А β пептиду.

2.4. Процедура введения вакцин. Две группы мышей C57BL/6 (экспериментальная и контрольная) методом TriGrid система электропорации (ЭП) были иммунизированы 10 мкг/мышь AV-1955 или AV-1955 вакцинами на 0, 14, 28 и 42-й день в одну из передних большеберцовых мышц. Аналогичным методом 0,5 мл (1 мг/мл) плазмидной ДНК были вакцинированы кролики. Иммунизация проводилась четыре раза каждые две недели.

Две группы макак-резусов (экспериментальная и контрольная) были вакцинированы 4 мг/животное AV-1955 вакциной. Все макаки методом ЭП были вакцинированы в четырехглавую мышцу на 0, 2, 6, 26, 44 и 48-й неделях.

2.5. Детекция, изотипирование анти-А β антител и картирование В-клеточного ответа. Концентрации и титры анти-А β антител в сыворотках мышей, кроликов и макак-резусов были определены стандартным иммуноферментным анализом (ИФА). В 96-луночные микропланшеты, покрытие 50 мл (100 мкг/мл) растворимым А β_{42} , были инкубированы 50 мл сыворотки в различных разведениях. В качестве вторичных антител были использованы HRP-конъюгированные анти-мышинные, анти-кроличьи и анти-обезьяньи IgG (1:5000; Pierce, Rockford, IL). Оптическая плотность (ОП) была прочитана под 450 нм (Biotek, Synergy HT, Winooski, VT). Титры антител были

подсчитаны на основании результатов самых высоких разведений, которые в два раза превышали граничное (фоновое) значение. Фоновое значение было определено в неиммунной сыворотке с тем же разбавлением.

Для картирования В-клеточного ответа у мышей и макак-резусов был использован метод конкурентного ИФА. Иммунные сыворотки мышей и макак-резусов были разведены 1:500 и 1:250 соответственно и смешаны с короткими перекрывающимися пептидами ($A\beta_{2-10}$, $A\beta_{1-11}$, $A\beta_{1-12}$, $A\beta_{2-13}$, $A\beta_{3-14}$, $A\beta_{5-16}$, $A\beta_{7-18}$; GenScript, Piscataway, NJ) или $A\beta_{42}$ (American Peptide Company, Sunnyvale, CA) пептидом в разных концентрациях. После преинкубации с пептидами стандартным методом ИФА было определено связывание иммунных сывороток с $A\beta_{42}$. Процент связывания сывороток, заблокированных короткими пептидами с $A\beta_{42}$ микропланшет был рассчитан относительно связывания сывороток без конкурирующих пептидов к $A\beta_{42}$, взятых за 100%.

2.6. Определение продукции IFN- γ методом ELISPOT анализа. Анализ Т-клеток, продуцирующих цитокин IFN- γ , иммунизированных мышей и макак был исследован в культуре спленоцитов мышей и PBMC макак-резусов, методом ELISPOT (BD Biosciences, San Jose, CA). Культуры спленоцитов были *in vitro* рестимулированы индивидуальными пептидами P2, P21, P23, P30, P32, HBsAg, HBVnc, MT, P7, P17, P28, коктейлем этих пептидов, растворимым $A\beta_{40}$ или же контрольным пептидом – 16-мер tau-протеина человека (отрицательный контроль). Пятно-формирующие колонии были подсчитаны CTL-ImmunoSpot S5 Macro Analyzer (Cellular Technology Ltd., Shaker Heights, OH) анализатором.

2.7. Анализ взаимодействия анти- $A\beta_{1-11}$ антител с различными формами $A\beta_{42}$ пептида методом поверхностно-плазмонного резонанса (SPR). Исследование связывания был выполнен на платформе SPR BIAcore 2000 (Biacore). Мономерные, олигомерные и фибриллярные формы $A\beta_{42}$ пептида были иммобилизованы на поверхность биосенсорного чипа (CM5). Серийные разведения анти- $A\beta_{1-11}$ антител, 6E10 и мышиных IgG (125, 250 и 500 нМ) в рабочем буфере, pH 7.4 были введены 5 мл/мин через каждую иммобилизованную форму пептида, после чего была измерена кинетика ассоциации/ диссоциации, как изменение SPR сигнала (в резонансных единицах). Обработка данных была проведена BIAevaluation 4.1.1 программой.

2.8. Анализ нейротоксичности методом МТТ. В 96-луночные планшеты (Immulon II; Dynax Laboratories, VA) были добавлены SH-SY5Y клетки человеческой нейробластомы в среде DMEM и инкубированы 24 часа в 5% CO₂ инкубаторе при 37° С. $A\beta_{42}$ олигомеры и фибриллы были инкубированы без или с очищенными из иммунной сыворотки кроликов или макак-резусов анти- $A\beta_{1-11}$ антителами на час при комнатной температуре. Затем, пептид/анти- $A\beta_{1-11}$ антитела смеси была добавлена в лунки с SH-SY5Y клетками и инкубирована 48 часов в 5% CO₂ инкубаторе при 37° С. Параллельно были поставлены ничем не обработанные контрольные образцы SH-SY5Y клеток. После инкубации с помощью МТТ в соответствии с инструкциями изготовителя (Promega Corp., WI) была анализируется нейротоксичность. Оптическая плотность (OD) при 570 нм измерялась аппаратом Synergy HT Microplate reader (Biotek, VT).

2.9. Обнаружение $A\beta$ бляшек в тканях мозга человека методом иммуногистохимии. Фиксированные срезы тканей коры головного мозга толщиной 40 мкм с патологией БА были инкубированы иммунными сыворотками кроликов в разведении 1:250 или очищенными анти- $A\beta$ антителами макак-резусов в разведении 1:1000. В качестве положительного контроля были использованы мышинные моноклональные 6E10 антитела против человеческого $A\beta$ в разведении 1:1500. В качестве вторичных антител были использованы HRP- конъюгированные анти-

кроличьи (Jackson ImmunoResearch Laboratories) или анти-обезьяне (Jackson ImmunoResearch Laboratories) IgG. В роли субстрата был использован DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Vector Laboratories). Изображения бляшек были получены с помощью цифровой камеры (Olympus, Center Valley, PA) под увеличением 10×.

2.10. Дот-блот анализ сывороток макак-резусов. На нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare, Piscataway, NJ) были нанесены по одному мкл (1 мкг каждый) P2, P21, P23, P30, P32, HBsAg, HBVnc, MT, P7, P17, P28 (GenScript, Piscataway, NJ) пептида, а так же Aβ₄₂ как контроль. После блокирования мембраны были покрыты иммунными сыворотками макак (1:200) с последующей инкубацией HRP-конъюгированными анти-обезьянными антителами (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) и проявкой реагентом люминол.

2.11. Статистический анализ. Статистические показатели (среднее значение (mean), стандартное отклонение (SD), статистическая значимость (*p*) были рассчитаны с использованием программы Prism 6 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). Статистически существенные различия были изучены с помощью twotailed t test или анализа вариаций и Tukey's multiple comparisons posttest (значения *p-value* < 0.05 (*p* < 0.05) были приняты как статистически значимые, достоверные).

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Конструирование ДНК-вакцины AV-1955 и оценка ее экспрессии в клетках млекопитающих

В настоящее время, одним из наиболее перспективных стратегий снижения уровня токсичных форм Aβ в мозге является иммунотерапия посредством специфических антител [Orgogozo J M et al., 2003]. Доклинические и клинические данные свидетельствуют о том, что развитие безопасной и эффективной анти-Aβ иммунотерапии для лечения БА требует терапевтические уровни анти-Aβ антител, избегая при этом образования аутореактивных Т-клеток. Последующие исследования показали, что антигенные детерминанты Aβ₄₂, презентируемые В-клеткам и Т-хелперным клеткам, локализованы в разных регионах пептида [Ghochikyuan A et al., 2009] и антитела, специфичные к N-концевой области Aβ₄₂ значительно снижают Aβ-нагрузку в мозге трансгенных мышей APP. На основании этих данных, а также, учитывая преимущества ДНК-вакцин по сравнению с белковыми и вирусными вакцинами, становится особенно целенаправленной стратегия эпитоп-основанной ДНК-вакцины [Agadjanyan M G et al., 2005], где собственный Т-клеточный эпитоп, можно заменить чужеродным эпитопом. Дизайн такой вакцины представлен на рисунке 1А. Учитывая все вышеперечисленные факты, опираясь на данные, полученные в предыдущих исследованиях, были созданы ДНК-вакцины pN-3Aβ₁₋₁₁-PADRE-8Ther (AV-1955) и pN-3Aβ₁₋₁₁-PADRE-11Ther (AV-1959), (рис.1В). Затем была оценена экспрессия протеина, кодированного AV-1955 конструкцией и отщепление сигнальной последовательности Igkss, способствующей посттрансляционному транспорту протеина через клеточную мембрану, соответствующим образом, что крайне необходимо для получения протеин со свободной N-концевой аспаргиновой кислотой. Результаты IP/WB показали, что AV-1955 вакцина экспрессируема и способствует синтезу секретируемого из клеток протеина N-3Aβ₁₋₁₁-PADRE-8Ther, со свободной N-концевой аспарагиновой кислотой, что свидетельствует о правильности отщепления Igkss (рис.1С,Д).

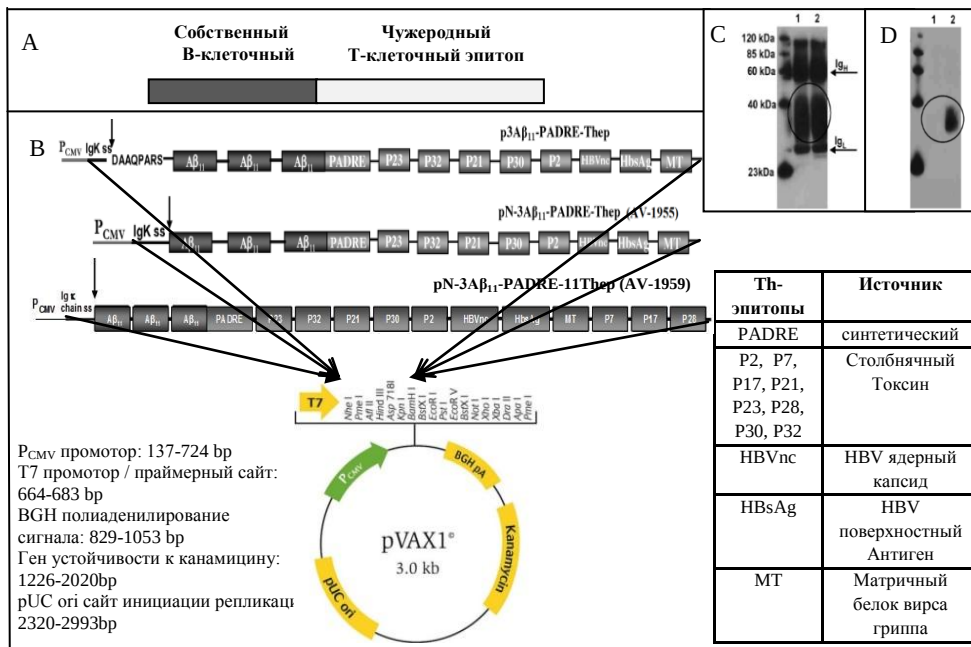


Рис. 1 (А) Дизайн эпипотной вакцины, включающий в себя собственный В-клеточный эпипот $A\beta_{42}$ пептида и чужеродный Т-клеточный эпипот. (В) Схематическое изображение AV-1955 и AV-1959 конструкций. (С, D) Оценка экспрессии pN-3A β_{1-11} -PADRE-8Ther и правильности отщипления сигнальной последовательности с формированием свободной N-концевой аспарагиновой кислоты в первой копии $A\beta_{1-11}$ секретированного протеина методом IP/WB (p3A β_{1-11} -PADRE-8Ther (линия 1) и pN-3A β_{1-11} -PADRE-8Ther (линия 2)). Оба белка иммунопреципитированы 6E10 антителами. Окрашивание производилось 6E10 (А) или кроличьими антителами, специфичными к N-концу пептида $A\beta$ (В).

3.2. Иммунологическая эффективность AV-1955 вакцины у кроликов

Анализ гуморального иммунного ответа по результатам ИФА показал, что иммуногенность AV-1955, по сравнению с вакциной p3A β_{1-11} -PADRE после 2, 3 и 4-й иммунизаций, была значительно выше (** $p \leq 0.001$), (рис. 2А). Следует отметить, что IgG и IgM изотипирование анти- $A\beta$ антител показало, что AV-1955 вакцина приводит к синтезу анти- $A\beta$ антител IgG изотипа (** $p = 0.001$), что говорит о Th-опосредованном гуморальном иммунном ответе (рис. 2В).

Чтобы понять связана ли столь высокая разница в анти- $A\beta$ антительном ответе с наличием свободной N-концевой аминокислоты $A\beta_{1-11}$ в AV-1955 вакцине, был проведен ИФА анализ. Данные показали, что специфичность связывания антител после иммунизации AV-1955 или p3A β_{1-11} -PADRE незначительна ($p \geq 0.05$), (рис. 3). Это свидетельствует о том, что свободный N-конец не влияет на специфичность антител. Таким образом, это скорее всего не модификация N-концом делает AV-1955 вакцину более иммуногенной в кроликах, а добавление в неё множества Th-эпитопов.

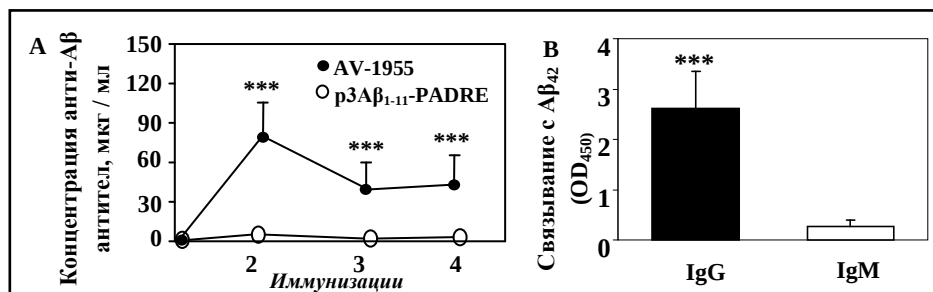


Рис. 2 (А) Анти-Аβ антительный ответ у кроликов, иммунизированных AV-1955 вакциной. (В) IgG и IgM изотипирование анти-Аβ антител посл второй иммунизации кроликов AV-1955 вакциной. Столбики ошибок указывают SD (n=9). Значения $p < 0.05$ были приняты как статистически значимые.

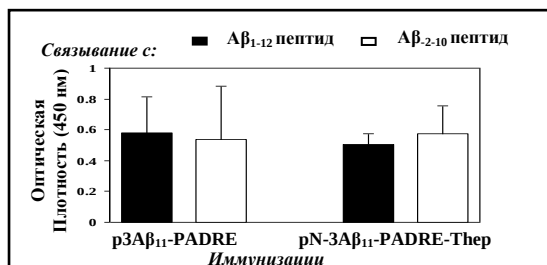


Рис. 3 Связывание сывороток кроликов, вакцинированных p3Aβ₁₋₁₁-PADRE или AV-1955, с пептидами с наличием свободной N-концевой аспарагиновой кислотой и без неё. Столбики ошибок указывают SD (n = 9), $p > 0.05$.

Характеристики анти-Аβ антител, генерированных AV-1955 вакциной в кроликах показали их функциональность, безопасность и специфичность *in vitro* так как они: (i) способны распознавать агрегированные патологические формы Аβ₄₂ пептида (мономеры, фибриллы и олигомеры), (табл. 1); (ii) ингибируют Аβ₄₂ фибрилл- и олигомер-опосредованную нейротоксичность на SH-SY5Y клетки человеческой нейробластомы (табл. 2); (iii) специфически связываются с Аβ бляшками на срезах человеческого мозга с патологией БА (рис. 4).

Таблица 1

Константы диссоциации (K_D) анти-Аβ₁₋₁₁/пептидные комплексы для олигомерных, мономерных и фибриллярных Аβ₄₂ по сравнению с контролем (кроличьи IgG), измеренные посредством SPR анализа, $p < 0.05$

Формы Аβ ₄₂ пептида	Аβ ₄₂ мономеры	Аβ ₄₂ фибриллы	Аβ ₄₂ олигомеры
Константа диссоциации (K_D)	2.22×10^{-7} М	2.03×10^{-7} М	7.04×10^{-8} М

Таблица 2

Жизнеспособность клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, оценённая посредством МТТ анализа, $p < 0.05$.

Преинкубация с	SH-SY5Y + Аβ ₄₂ фибриллы	SH-SY5Y + Аβ ₄₂ олигомеры	SH-SY5Y (контроль)
----------------	-------------------------------------	--------------------------------------	--------------------

Кроличьими анти-Аβ ₁₁ антителами	93%	83.7%	100%
Кроличьими IgG	0%	0%	100%
Без преинкубации какими-либо антителами	0%	0%	100%

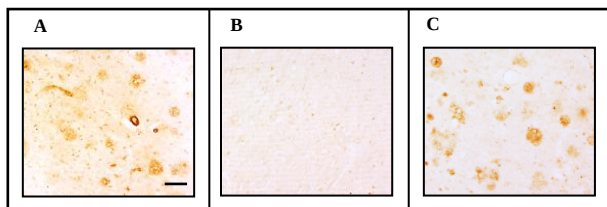


Рис. 4 (А) Связывание иммунных сывороток кроликов к человеческим Аβ бляшкам срезов тканей коры головного мозга с патологией БА. (В) Связывание иммунных сывороток к Аβ бляшкам

специфично (иммунные сыворотки были предварительно блокированы абсорбцией с 2,5 мкМ Аβ₄₂ пептидом) (С) В качестве позитивного контроля были использованы антитела 6E10. Оригинальное увеличение составляет 10×, линейный масштаб – 100 мкм.

3.3. Изучение иммунологической эффективности AV-1955 вакцины на макаках-резусах

Анализ гуморального иммунного ответа макак-резусов методом ИФА показал стойкий иммунный ответ со значительно высокими титрами Аβ-специфических антител (**P<0.001) в экспериментальной группе по сравнению с контрольной (рис. 5). Изотипирование антител сыворотки на 8-й неделе показало, что подавляющее большинство Аβ-специфических антител со статистически значимой разницей принадлежали классу IgG (**P = 0.001), что указывает на Th-опосредованный гуморальный иммунный ответ.

Характеристики анти-Аβ антител, генерированных AV-1955 вакциной у макак-резусов показали их функциональность и безопасность *in vitro* так как они: (i) способны распознавать агрегированные патологические формы Аβ₄₂ пептида (мономеры, фибриллы и олигомеры), (табл. 3); (ii) ингибируют Аβ₄₂ фибрилл- и олигомер-опосредованную нейротоксичность на SH-SY5Y клетках человеческой нейробластомы (табл. 4); (iii) специфически связываются с Аβ бляшками на срезах человеческого мозга с патологией БА (рис. 6).

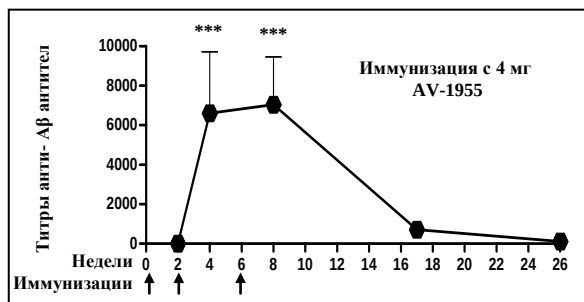


Рис. 5 Анти-Аβ гуморальный иммунный ответ макак-резусов, иммунизированных AV-1955 вакциной. В сыворотках макак-резусов было оценено среднее значение конечных точек титрования. Столбики ошибок указывают SD (n=5), *** p<0.001.

Таблица 3

Константы диссоциации (K_D) анти- $A\beta_{1-11}$ /пептидные комплексы для олигомерных, мономерных и фибриллярных $A\beta_{42}$ по сравнению с контролем (обезьяны IgG), измеренные посредством SPR анализа, $p < 0.05$.

Формы $A\beta_{42}$ пептида	$A\beta_{42}$ мономеры	$A\beta_{42}$ фибриллы	$A\beta_{42}$ олигомеры
Константа диссоциации (K_D)	$19.2 \pm 0.4 \times 10^{-8} M$	$9.96 \pm 0.04 \times 10^{-8} M$	$2.52 \pm 0.06 \times 10^{-8} M$

Таблица 4

Жизнеспособность клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, оценённая посредством МТТ анализа, $p < 0.05$.

Преинкубация с	SH-SY5Y + $A\beta_{42}$ фибриллы	SH-SY5Y + $A\beta_{42}$ олигомеры	SH-SY5Y (контроль)
Анти- $A\beta_{11}$ антителами макак-резусов	94%	82%	100%
Обезьяньими IgG	0%	0%	100%
Без преинкубации какими-либо антителами	0%	0%	100%

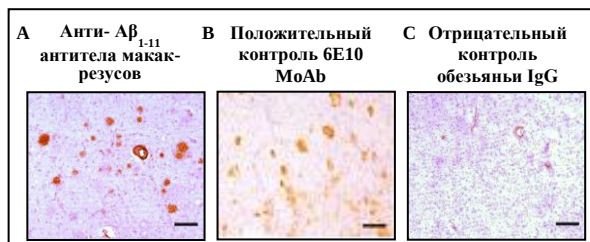


Рис. 6 (А) анти- $A\beta$ антитела макак-резусов, индуцированные AV-1955 вакциной, (С) в отличие от обезьяньих IgG (отрицательный контроль), связывают человеческие $A\beta$ бляшки срезов тканей коры головного мозга с

патологией БА. (В) В качестве положительного контроля были использованны антитела – 6E10. Оригинальное увеличение составляет $10\times$, линейный масштаб – 100 мкм.

Оценка клеточного иммунного ответа в PBMCs экспериментальных и контрольных макак-резусов методом $IFN-\gamma$ ELISPOT на 7-й и 49-й неделях показала, что Т-клеточный иммунный ответ специфичен к чужеродным Th-эпитолам MultiTER платформы и не распознаёт собственные Т-клеточные эпитопы $A\beta_{42}$, приводящие к активации аутореактивных Т-клеток даже после шести иммунизаций AV-1955 вакциной в течение 18 месяцев, что говорит о безопасности AV-1955 вакцины (табл. 5).

С целью получения большей информации для понимания кинетики и продолжительности динамики гуморального иммунного ответа, было решено после 18-и недельного покоя провести ревакцинацию макак-резусов AV-1955 вакциной на 26, 44 и 48-й неделях методом ЭП. Результаты показали, резкий подъём титров анти- $A\beta$ антител с последующим медленным динамическим спадом в течение 25 недель, что говорит о длительном сохранении гуморального иммунного ответа у макак-резусов (рис. 7).

Таблица 5

Сравнение клеточного иммунного ответа в PBMCs экспериментальных и контрольных макак-резусов методом IFN- γ ELISPOT на 7-й и 49-й неделях, получивших AV-1955 вакцину или pVAX вектор соответственно.

Иммунизация	Неделя 7	Неделя 49
AV-1955*	97 $\pm$ 16.4	435 $\pm$ 57.1
pVAX*	8.9 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.4
Статистическая значимость (p)	*** $p < 0.001$	*** $p < 0.001$

* PBMCs макак-резусов, получивших AV-1955 и pVAX вектор (контрольная группа), не способствовали активации INF- γ T-клеточного ответа после рестимуляции пептидом A β ₄₀.

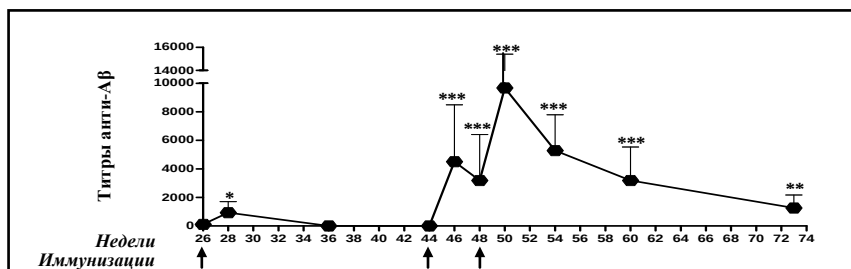


Рис. 7 Продолжительность динамики гуморального иммунного ответа на AV-1955 вакцину у макак-резусов. Среднее значение конечных точек титрования анти-A β антител в сыворотке макак, получивших дополнительную иммунизацию AV-1955 вакциной. Столбики ошибок указывают SD, n=5, p<0.05.

3.4. Оценка иммунологической эффективности AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 у мышей

Для сравнения иммуногенности вакцины AV-1955 с AV-1959 две группы мышей C57BL/6, H-2^b гаплотипа, методом ЭП были иммунизированы на 0, 14, 28 и 42-й день данными вакцинами. Сыворотки, изолированные из крови мышей на 12-й день после третьей иммунизации, были использованы для анализа гуморального иммунного ответа. На 7-й день, посл четвертой иммунизации, мыши были умерщвлены, а спленоциты, выделенные из их селезёнок были использованы для выявления клеточного иммунного ответа. Кроме того, было решено впервые охарактеризовать репертуар В- и Т-клеточного иммунного ответа.

Анализ гуморального иммунного ответа методом ИФА показал, что AV-1959 вакцина способствовала синтезу анти-A β антител в более высоких концентрациях со статистически значимой разницей чем AV-1955 (**P < 0.01), (рис. 8А). Картирование В-клеточных эпитопов методом конкурентного ИФА показало, что сыворотка мышей, иммунизированных обеими вакцинами при концентрации 5мкМ демонстрирует высокую распознаваемость до 80-95% четырёх пептидов, охватывающих KMDAEFRHDSGY (A β ₂₋₁₀), MDAEFRHDSGYE (A β ₁₋₁₁), DAEFRHDSGYEV (A β ₁₋₁₂) и AEFRHDSGYEVH (A β ₂₋₁₃) аминокислоты. Тем не менее, удаление одной аминокислоты – аланина в EFRHDSGYEVNH (A β ₃₋₁₄) пептиде, значительно ингибирует связывание иммунной сыворотки мышей, относительно положительного контроля (**P<0.01). Обе

иммунные сыворотки не распознали RHDSGYEVHHQK ($A\beta_{5-16}$) и DSGYEVHHQKLV ($A\beta_{7-18}$) пептиды (рис. 8B,C).

Эти результаты говорят о том, что AEFRH ($A\beta_{2-6}$) является самой маленькой последовательностью, которая распознается анти- $A\beta$ антителами иммунной сыворотки мышей в ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины и, кроме того, свободная аспаргиновая кислота не играет никакой роли в иммуногенности данных ДНК-вакцин у мышей.

Далее был анализирован клеточный иммунный ответ в спленоцитах, выделенных из селезёнок мышей, вакцинированных AV-1955 и AV-1959 и рестимулированных *in vitro* условиями пептидом $A\beta_{40}$ или коктейлем пептидов, входящих в состав MultiTER платформы AV-1959.

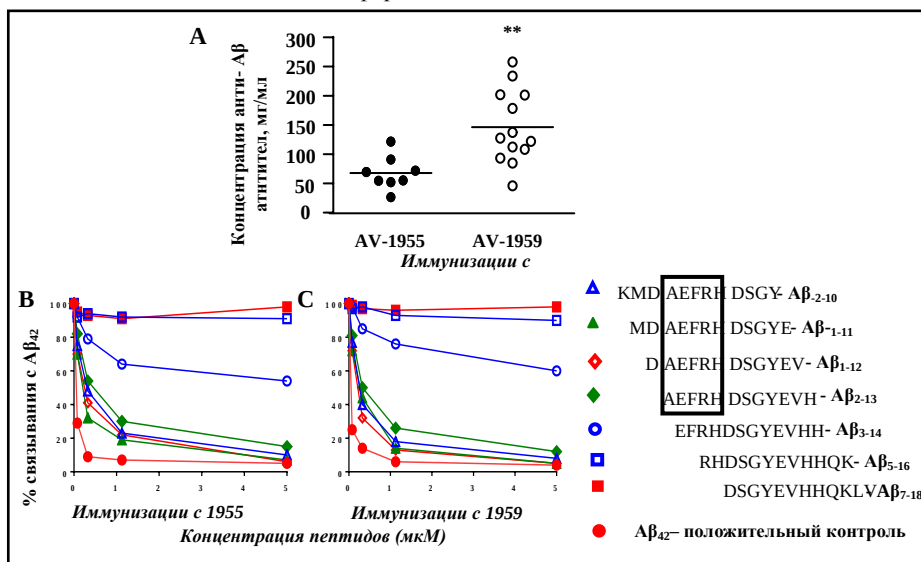


Рис. 8 Сравнение гуморального иммунного ответа мышей H-2^b гаплотипа, иммунизированных AV-1955 (n=8) и AV-1959 (n=13) ДНК-вакцинами, ** $p < 0.01$.

По результатам, обе вакцины не индуцировали аутореактивный иммунный ответ, показав фоновый уровень IFN- γ -продуцирующих клеток после рестимуляции иммунных спленоцитов $A\beta_{40}$ пептидом, анализированных методом ELISPOT. И наоборот, спленоциты, выделенные из селезёнок мышей, получивших обе вакцины и рестимулированные коктейлем из 12 пептидов, представляющие чужеродные Th-эпитопы, способствовали активации клеточного иммунного ответа (рис. 9A). Кроме того, клеточный иммунный ответ на AV-1959 был значительно выше, чем ответ на вакцинацию AV-1955 (* $P < 0.05$), (рис. 9A). Можно предположить, что именно добавление трёх новых эпитопов из TT (P7, P17 и P28) в MultiTER платформу отвечает за повышение иммуногенности вакцины AV-1959. Чтобы подтвердить эту гипотезу, было решено повторно анализировать Th-клеточный иммунный ответ, но уже рестимулированием иммунных спленоцитов отдельными пептидами, входящими в состав MultiTER платформы AV-1959 вакцины. Картирование Th-клеточного ответа показало статистически значимую активацию обеими вакцинами Th-клеток специфичных PADRE, P21, P30, и P2 эпитопам (рис. 9B,C). Важно отметить, что, как и

предполагалось, в спленоцитах селезёнок мышей, иммунизированных AV-1959 (рис. 9С), были обнаружены Th-клетки специфичные к двум новым пептидам, P7 и P17, включённым в состав MultiTER платформы, чего не было обнаружено в спленоцитах селезёнок мышей, иммунизированных AV-1955 (рис. 9С). Хотя, некоторые эпитопы MultiTER платформы у некоторых мышей оказались неиммуногенными, следует отметить, что они, как известно, обладают иммуногенностью в человеке [James E et al., 2007]. Таким образом, сравнение иммуногенности вакцины AV-1955 с AV-1959 на инбредных мышах H-2^b иммунного гаплотипа показало, что включение дополнительных Th-эпитопов в MultiTER платформу значительно повысила её иммуногенность.

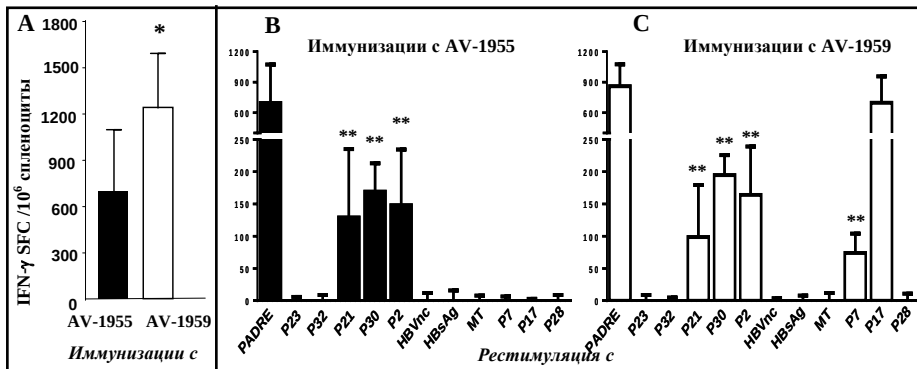


Рис. 9 Сравнение клеточного иммунного ответа мышей H-2^b гаплотипа, иммунизированных AV-1955 или AV-1959 ДНК-вакцинами. (А) AV-1959 индуцирует более сильный Th-клеточный ответ со статистически значимой разницей, чем AV-1955 вакцина. Данные представляют собой средние результаты, полученные в 2-х отдельных экспериментах. Столбики ошибок указывают среднее значение $\pm$ SD (* $P \leq 0.05$, $n=6$ на группу). (В, С) Картирование Th-эпитопов, выявленных антиген-специфичными Th-клетками, синтезированными в ответ на иммунизацию мышей AV-1955 (В) и AV-1959 (С) вакцинами. Столбики ошибок указывают среднее значение $\pm$ SD ($n=6$ на группу). Статистическая значимость разности была высчитана в сравнении с PADRE-специфическими IFN- γ SFC (** $P \leq 0.01$).

3.5. Иммунологическая эффективность AV-1959 вакцины и её сравнительная характеристика с AV-1955 у макак-резусов

Анализ гуморального иммунного ответа методом ИФА у индивидуальных макак-резусов, вакцинированных AV-1955 или AV-1959, показал, что обе вакцины одинаково эффективны в стимулировании синтеза анти-А β антител. Кроме того, данный гуморальный иммунный ответ характеризуется резким подъемом титров антител с последующим медленным динамическим спадом, при котором титры антител у 7 из 10 макак, были обнаружены даже после почти 1.2 лет (неделя 106) после последней иммунизации (рис. 10 А). Изотипирование анти-А β антител на 50-й неделе показало, что обе вакцины с достоверной разницей способствуют синтезу анти-А β антител IgG изотипа (** $P=0.001$).

Данные картирования В-клеточных эпитопов иммунных сывороток показали, что процент связывания анти-А β антител иммунных сывороток макак-резусов получивших

AV-1955 и AV-1959 вакцины с пептидными последовательностями DAEFRHDSGYEV (Aβ₁₋₁₂) и AEFRHDSGYEVH (Aβ₂₋₁₃) при концентрации 5мкМ составлял 92% и 88% соответственно (рис. 10 В,С). Те же самые иммунные сыворотки связывают KMDAEFRHDSGY (Aβ₂₋₁₀) и MDAEFRHDSGYE (Aβ₁₋₁₁) пептиды, содержащие AEFRH (Aβ₂₋₆) последовательность, с более низкой аффинностью (75-78%), в то время как удаление аланина из AEFRHDSGYEVH (Aβ₂₋₁₃) значительно ингибирует связывание анти-Aβ антител относительно положительного контроля (**P≤ 0.01), (рис. 10 В,С). Как и у мышей, картографические данные иммунной сыворотки макак-резусов показали, что ante-Aβ антитела не распознают RHDSGYEVHHQK (Aβ₅₋₁₆) и DSGYEVHHQKLV (Aβ₇₋₁₈) пептиды. Эти результаты говорят о том, что AEFRH (Aβ₂₋₆) последовательность является самым коротким иммуногенным В-клеточным эпитопом.

Далее, впервые был анализирован гуморальный иммунный ответ специфичный к чужеродным эпитопам, входящим в состав MultiTEP платформы у макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 вакцинами методом дот-блот.

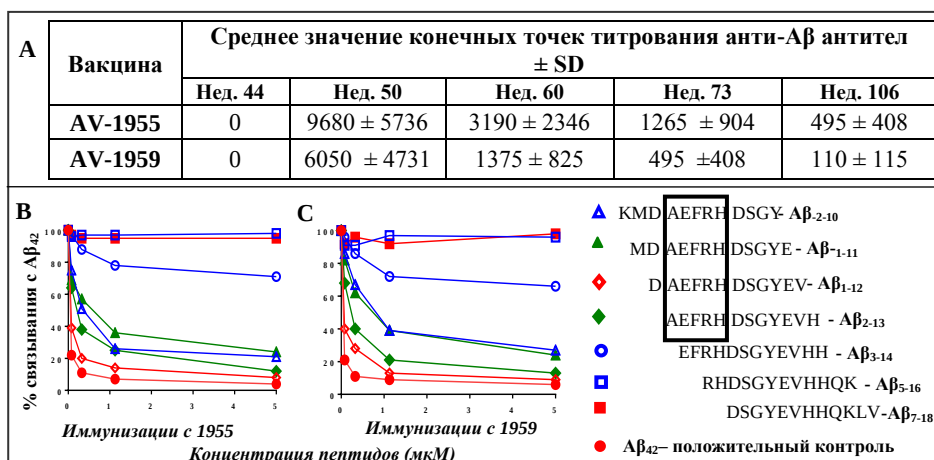


Рис. 10 Сравнение гуморального иммунного ответа в сыворотках макак-резусов, иммунизированных AV-1955 (n=5) или AV-1959 (n=5) ДНК-вакцинами.

Данные показали, что обе вакцины у макак-резусов индуцируют антитела специфичные только к Aβ₁₋₁₁ и не стимулируют В-клетки, продуцирующие антитела специфичные к чужеродным Th-эпитопам, использованным в дизайне MultiTEP платформы (рис. 11).

Данные Т-клеточного ответа методом ELISPOT у макак показали, что обе вакцины идентично активируют клеточный иммунный ответ (P>0.05), (рис. 12). По результатам ELISPOT анализа, обе вакцины не индуцировали клеточный иммунный ответ на рестимуляцию иммунных спленоцитов Aβ₄₀ пептидом, что говорит о безопасности вакцин. Полученные данные Т-клеточного картирования показали, что каждая макака, имея определённый набор МНС класса II молекулу, по-разному ответила на различные Th-эпитопы MultiTEP платформы (табл. 6).

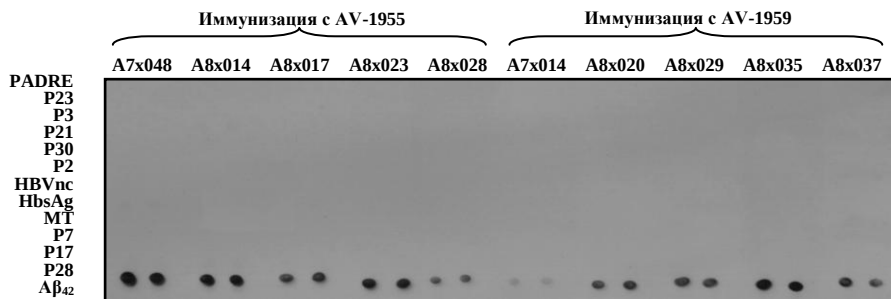


Рис. 11 Анализ связывания сывороток макак-резусов (50-й недели) к пептидам MultiTер платформы и к Аβ₄₂ пептиду методом дот-блот.

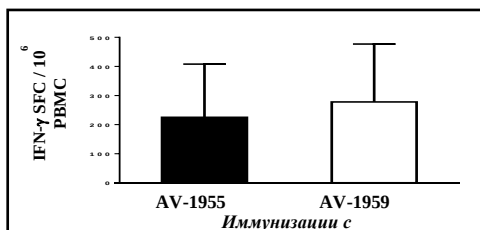


Рис. 12 Сравнение клеточного иммунного ответа в PBMCs макак-резусов, иммунизированных AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцинами. Столбики ошибок показывают среднее значение $\pm$ SD ($n = 5$ на группу), $p > 0.05$.

Таблица 6

Т-клеточные ответы PBMCs макак-резусов, иммунизированных AV-1955 или AV-1959 вакцинами на индивидуальные Th-эпитопы.

Вакцина	Макака #	Th- эпитопы											
		PADRE	P23	P32	P21	P30	P2	HBVnc	HBsAg	MT	P7	P17	P28
AV-1955	A7x048	+	-	+	+	-	-	+	-	-	NA	NA	NA
	A8x014	+	-	+	-	+	+	+	-	+	NA	NA	NA
	A8x017	+	-	-	-	+	+	+	-	-	NA	NA	NA
	A8x023	+	+	-	+	-	+	-	-	+	NA	NA	NA
	A8x028	+	-	-	+	-	-	-	+	-	NA	NA	NA
AV-1959	A7x014	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	A8x020	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	A8x029	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	A8x035	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	A8X037	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
% ответа		100	20	60	50	30	60	50	20	20	0	60	40

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертационной работе представлена идея создания эпитопных ДНК-вакцин, направленных против БА, состоящих из нескольких копий собственных В-клеточных эпитопов пептида Аβ₄₂ и различных чужеродных Th-клеточных эпитопов. Следуя этой идее, были созданы AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцины на основе эпитопов, тестированные на мышах, кроликах и макаках-резусах. Так как известно, что ДНК-вакцины обладают относительно низкой иммуногенностью в данных исследованиях ДНК-вакцина была усовершенствована включением в её состав трёх копий собственных В-клеточных эпитопов пептида Аβ₄₂ (Аβ₁₋₁₁) и девяти/двенадцати

дополнительных Th-эпитопов – MultiTER. А также, с целью повышения эффективности трансфекции ДНК в клетки, для иммунизации была использована TriGrid система электропорации.

Результаты AV-1955 и AV-1959 вакцинаций, продемонстрировали высокую иммуногенность, относительную безопасность, так как они не способствовали активации потенциально опасных аутореактивных Т-клеток, вместе с тем, генерируя, терапевтически эффективные Аβ-специфичные антитела IgG класса, как у мышей, так и у кроликов и макак-резусов. Данные исследования показали, что AV-1955 и AV-1959 способствуют синтезу достоверно высокого Аβ-специфичного гуморального иммунного ответа во всех животных по сравнению с контролем. Анти-Аβ₁₋₁₁ антитела, выделенные из сывороток кроликов и макак-резусов, распознали все формы человеческого Аβ пептида; были способны связать амилоидные бляшки на срезах человеческого мозга с патологией БА *ex vivo*; снизили олигомер- и фибриллопосредованную нейротоксичность в культуре клеток нейробластомы человека, значительно повысив выживаемость клеток до 82%-94%. Картирование В-клеточного ответа показало, что AEFRRH (Аβ₂₋₆) является самым коротким иммуногенным В-клеточным эпитопом, распознаваемым анти-Аβ антителами, синтезированными в мышцах и макаках-резусах в ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины. Удаление аланина из AEFRRHSGYEVH (Аβ₂₋₁₃) пептида значительно снижает аффинитет анти-Аβ антител, синтезированных в мышцах и макаках-резусах в ответ на AV-1955 и AV-1959 вакцины. Картирование Т-клеточного ответа показало, что Th-эпитопы MultiTER платформы AV-1955 и AV-1959 вакцин имеют разную иммуногенность у индивидуальных макак-резусов, связанную с полиморфностью генов молекулы МНС класса II. И наконец, AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцины у мышей, кроликов и макак-резусов стимулируют клеточный иммунный ответ специфичный к чужеродным Th-эпитопам и не распознающий собственные Т-клеточные эпитопы Аβ₄₂, приводящие к активации аутореактивных Т-клеток.

Современные достижения в развитии диагностических и прогностических методов позволяют успешно реализовать данную схему ДНК вакцинации.

ВЫВОДЫ

1. ДНК-вакцины, синтезированные на основе MultiTER платформы, состоящие из трёх копий собственных В-клеточных эпитопов пептида Аβ₄₂ (Аβ₁₋₁₁) и девяти/двенадцати чужеродных Th-эпитопов (AV-1955/AV-1959) у кроликов и макаках-резусов индуцируют продукцию анти-Аβ специфичных антител, распознающих агрегированные формы Аβ₄₂ пептида, способных ингибировать Аβ₄₂-опосредованную нейротоксичность и специфически связывающихся с амилоидными бляшками.
2. AV-1955 и AV-1959 ДНК-вакцины у мышей, кроликов и резус-макак стимулируют антиген-специфический клеточный и гуморальный иммунный ответ, но не индуцируют активацию аутореактивных Т-клеток и В-клеток, специфически распознающих чужеродные Th-эпитопы MultiTER платформы.
3. Установлено, что наличие свободной N-концевой аспарагиновой кислоты В-клеточного эпитопа Аβ₁₋₁₁ не влияет на иммуногенность AV-1955 и AV-1959 вакцин у мышей и кроликов, однако, у макак-резусов способствует незначительному повышению аффинности анти-Аβ антител и стойкому, длительно сохраняющемуся гуморальному иммунному ответу.
4. Картирование В-клеточного ответа показало, что пептид AEFRRH (Аβ₂₋₆) является самым коротким иммуногенным В-клеточным эпитопом,

распознаваемым анти-Аβ антителами, синтезированными у мышей и макак-резусов в ответ на иммунизацию вакцинами AV-1955 и AV-1959.

5. Выявлено, что удаление аланина из пептида AEFRHDSGYEVH (Aβ₂₋₁₃) значительно снижает аффинность анти-Аβ антител, синтезированных у мышей и макак-резусов в ответ на вакцинацию AV-1955 и AV-1959.
6. Картирование Т-клеточного ответа показало, что Th-эпитопы MultiTEP платформы AV-1955 и AV-1959 вакцин имеют разную иммуногенность у индивидуальных макак-резусов, что ассоциировано с полиморфностью генов молекул МНС класса II.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ghochikyan A., Davtyan H., Petrushina I., Hovakimyan A., Movsesyan N., Davtyan A., Kiyatkin A., Cribbs D., Agadjanyan M. Refinement of a DNA based Alzheimer disease epitope vaccine in rabbits // Human Vaccine and Immunotherapeutic. 2013, 9(5), pp. 1002-10.
2. Davtyan H., Ghochikyan A., Petrushina I., Hovakimyan A., Davtyan A., Cribbs D., Agadjanyan M. MultiTEP platform-based AD epitope vaccine activates broad repertoire of T helper cells in non-human primates // Alzheimers Dement. 2014, 10(3), pp. 271-83.
3. Evans C., Davtyan H., Petrushina I., Hovakimyan A., Davtyan A., Hannaman D., Cribbs D., Agadjanyan M., Ghochikyan A. Epitope-based DNA vaccine for Alzheimer's disease: translational study in macaques // Alzheimers Dement. 2014, 10(3), pp. 284-95.
4. Davtyan H., Hovakimyan A., Zagorski K., Davtyan A., Petrushina I., Agdashian D., Murthy V., Cribbs D., Agadjanyan M., Ghochikyan A. BTX AgilePulse™ system is an effective electroporation device for intramuscular and intradermal delivery of DNA vaccine // Current Gene Therapy. 2014, 14(3), pp.190-9.
5. Овакимян А. ДНК вакцинация как наиболее эффективный и приемлемый метод при болезни Альцгеймера // Медицинская наука Армении. 2014, 54 (2), с.69-75.

ՀՈՎԱԿԻՄՅԱՆ ԱՐՄԻՆԵ ԱՇՈՏԻ

ԱՆՏԶԵՑՄԵՐԻ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ԴԵՄ ԴԼԹ – ՊԱՏՎԱՍՏԱՆՑՈՒԹԵՐԻ ՍՏԵՂԾՈՒՄԸ ԵՎ ԻՍՈՒՆԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱՐՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ ՓՈՂՁԱՐԿՈՒՄԸ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ՍՈՂԵԼՆԵՐԻ ՎՐԱ

ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

Բանալի բառեր. *Ալցհեյմերի հիվանդություն, պեպտիդ Aβ₄₂, ԴԼԹ-պատվաստանյութ, B-բջջային էպիտոպ, Th-էպիտոպ, իմունոգենություն:*

Ալցհեյմերի հիվանդությունը (ԱՀ) բնութագրվում է կլինիկորեն արագ զարգացող կոգնիտիվ խանգարումներով, որոնք, որպես կանոն, ախտորոշման

հաստատվելուց հետո 10 տարվա ընթացքում արդյունքում բերում են մահվան: ԱՀ նեյրոդեգեներատիվ հիվանդություն է, որի պատճառն է հանդիսանում անոմալ բետա-ամիլոիդների (Aβ₄₂) կուտակումները սենիլային բշտիկների տեսքով և հետագա նյարդային բջիջների կորուստով, գլխուղեղի վնասված հատվածներում: Հետևաբար, թերապևտիկ միջոցառումները ուղղված են անոմալ Aβ₄₂ կուտակումների ճնշմանը: Գլխուղեղում Aβ₄₂-ի թունավոր ձևերի մակարդակի նվազեցման առավել հեռանկարային տարբերակներից մեկն է իմունոթերապիան, սպեցիֆիկ հակամարմինների միջոցով:

Տվյալ աշխատանքում ներկայացված է Ալցհեյմերի հիվանդության (ԱՀ) բուժմանն ուղղված էպիտոպների վրա հիմնված ԴՆԹ-ի պատվաստանյութերի ստեղծումը: Վերջիններս բաղկացած են մի քանի սեփական B-բջջային էպիտոպների կրկնօրինակներից և ավանդական պատվաստանյութերի կամ տարբեր պաթոգենների օտարածին Th-բջջային էպիտոպներից, որոնց մարդիկ առնչվում են կյանքի ընթացքում, ինչպես օրինակ վիրուսային գրիպի էպիտոպները: Շնորհիվ գոյություն ունեցող հիշողության T-բջիջների ակտիվացման՝ այսպիսի օտարածին Th-էպիտոպներով պատվաստանյութերով իմունիզացիան ԱՀ վաղ և միջին տարիքի հիվանդներին կլինի անվտանգ և արդյունավետ: Այս գաղափարի հիման ԱՀ բուժման նպատակով ստեղծվել են AV-1955 և AV-1959 ԴՆԹ պատվաստանյութեր, որոնք փորձարկվել են մկների, ճագարների և մակակա-ռեզուսների վրա: Ինչպես հայտնի է ԴՆԹ պատրաստանյութը օժտված է հարաբերականորեն ցածր իմունոգենությամբ: Այս հետազոտություններում կիրառված ԴՆԹ պատվաստանյութի իմունոգենությունը բարձրացնելու նպատակով ներառվել է 3 օրինակ սեփական B-բջջային էպիտոպներ Aβ₄₂ (Aβ₁₋₁₁) պեպտիդի և 9/12 օտարածին Th-էպիտոպներ– MultiTEP: Լրացուցիչ կերպով, ԴՆԹ-ի տռանսֆեկցիայի արդյունավետության բարձրացման համար, իմունիզացիան իրականացվել է TriGrid էլոկտրոպորացիոն համակարգով: Ցուց է տրված, որ այս համակարգով իմունիզացիայի դեպքում գենի էքսպրեսիան ի համեմատ ԴՆԹ պլազմիդի ասեղնային ներարկման 100-ից – 1000 անգամ հավաստիորեն բարձրանում է:

Մկներին, ճագարներին և մակակա-ռեզուսներին AV-1955 և AV-1959 պատվաստանյութերով իմունիզացիայի արդյունքում ցույց է տրվել այս պատվաստանյութերի բարձր իմունոգենությունը և հարաբերական անվտանգություն, ինչը կապված է պոտենցիալ վտանգավոր աուտոռեակտիվ T-բջիջների ակտիվացման բացակայությամբ, դրա հետ մեկտեղ IgG դասի թերապևտիկ արդյունավետությամբ օժտված Aβ-սպեցեֆիկ հակամարմինների արտադրությամբ: Հետագայում AV-1955 և AV-1959 պատվաստանյութերով կլինիկական փորձարկումները հնարավոր դարձնելու համար, կատարվել է B- և T-բջջային պատասխանի քարտեզագրումը: Մկների և մակակա-ռեզուսների մոտ B-բջջային պատասխանի քարտեզագրումը ցույց է տվել, որ AEFRH (Aβ₂₋₆) հանդիսանում է ամենակարճ իմունոգենությամբ B-բջջային էպիտոպ: Ալանինի հեռացումը AEFRHDSGYEVH (Aβ₂₋₁₃) պեպտիդից զգալիորեն նվազեցնում է AV-1955 և AV-1959 պատվաստանյութերով իմունիզացված մկների և մակակա-ռեզուսների արյան շիժուկում առկա հակա-Aβ հակամարմնի մերձավորությունը: Անհատական

մակակա-ռեգուսների մոտ T-բջջային պատասխանի քարտեզագրումը ցույց է տալիս, որ AV-1955 և AV-1959 պատվաստանյութերի MultiTEP հարթակի տարբեր Th-էպիտոպները ցուցաբերում են տարբեր իմունոգենություն՝ կախված MHC II դասի մոլեկուլների զեների պոլիմորֆությունից: Եվ վերջապես, մկների, ճագարների, մակակա-ռեգուսների մոտ ԴՆԹ AV-1955 և AV-1959 պատվաստանյութերը խթանում են բջջային իմունային համակարգի սպեցիֆիկ օտարածին Th-էպիտոպներին՝ չճանաչելով Aβ₄₂ սեփական T-բջջային էպիտոպներին:

Այնուամենայնիվ, ակնհայտ է, որ պատվաստումը ԱՀ ուշ փուլերում սկսելու դեպքում, պաթոլոգիական Aβ-ի ճնշմանն ուղղված ամենամեծ իմունոգենությամբ պատվաստանյութն անգամ թերապևտիկ բավարար արդյունավետության չի կարող ցուցաբերել: Ախտորոշման ժամանակակից մեթոդները հնարավորություն են տալիս հաջողությամբ ներդնել ԱՀ-ի բուժմանն ուղղված ԴՆԹ պատվաստանյութերով պատվաստման պիտման առավելապես մինչև հիվանդության նախանշանների ի հայտ գալը՝ դիսկային խմբի մարդկանց մոտ կատարելով ԱՀ կենսաբանական ցուցանիշների սկրինինգ: Այսպիսով հնարավոր դարձնելով ուղեղում Aβ պաթալոգիայի նվազեցումը, կանխել թա պաթալոգիան և պահպանել ճանաչողական գործառնությունները:

ARMINE ASHOT HOVAKIMYAN

DESIGNING AND TESTING IMMUNOLOGICAL EFFICACY OF DNA-VACCINES FOR ALZHEIMER'S DISEASE IN AN ANIMALS MODELS

SUMMARY

Keywords: *Alzheimer's disease, peptide Aβ₄₂, DNA vaccine, B-cell epitope, Th-epitope, autoreactive T-cells, immunogenicity.*

Alzheimer's disease (AD) is characterized clinically by progressive cognitive decline, eventually resulting in death, usually within 10 years of diagnosis. AD is a neurodegenerative disease, the cause of which is the abnormal deposition of aggregated forms of amyloid-beta (Aβ₄₂) peptide as insoluble fibrils, soluble oligomers/protofibrils, senile plaques and neuronal loss in affected brain regions. Therefore, therapeutic measures aimed at suppressing the abnormal accumulation of Aβ peptide. Based on the intriguing finding, that a vaccine containing fibrillary Aβ₄₂, prevented the deposition of Aβ and reduce behavioral deficits in a number of animal studies, now one of the most promising strategies for reducing the level of toxic forms of Aβ in the brain is immunotherapy with specific antibodies via active immunization, which is a promising treatment for patients at early stages of AD to prevent, slow down or stop the development and progression of disease.

This thesis presents the idea of designing epitope-based DNA vaccines against AD, consisting of multiple copies of self B-cell epitopes, supplemented by various foreign

Th-cells epitopes form traditional vaccines or different pathogens, such as influenza virus epitopes. The use of such foreign Th-epitopes for immunizations of patients in the early stages of AD or patients of advanced age who have preexisting memory T-cell according to Th-epitopes would be safe and effective. Following this idea, were created AV-1955 and AV-1959 epitopes-based DNA vaccine against AD and were tested for mice, rabbits and rhesus macaques. Since it is known that DNA vaccines have relatively weak immunogenicity. Therefore, in these studies the DNA vaccine has been improved by including in its composition three copies short self immunodominant B-cell epitope of peptide A β ₄₂ (A β ₁₋₁₁) and 9/12 the nonself universal Th-cell epitopes – MultiTEP. However in clinical trials DNA vaccines are less effective in inducing potent immune responses due to the low delivery efficiency and expression of antigens. Therefore, in order to increase the efficiency of DNA transfection into cells for immunization was used TriGrid system electroporation, which contributes significant increase of gene expression *in vivo* from 100 to 1000 fold compared with needle injection of naked plasmid DNA.

Results AV-1955 and AV-1959 vaccinations, demonstrated high immunogenicity, relative safety, as they are not contributing to activation of potentially dangerous autoreactive T-cells, at the same time, generating a therapeutically effective anti-A β specific IgG antibodies in mice, rabbits and rhesus macaques. These studies showed that the AV-1955 and AV-1959 promotes synthesis of the significantly high long-term anti-A β specific humoral immune response and cellular immune responses specific to foreign Th-epitopes, but not to self-A β in all animals compared to controls. These results of B-cell mapping indicate that the AEFRH (A β ₂₋₆) sequence is the shortest immunogenic B cell epitope capable of inducing strong anti-A β antibody responses in mice and rhesus macaques in response to the AV-1955 and AV-1959 vaccines and removal of alanine from AEFRRHDSGYEVH (A β ₂₋₁₃) peptide significantly reduces the affinity of anti-A β antibodies. Mapping of T-cell responses showed that Th-epitopes of MultiTEP platform AV-1955 and AV-1959 vaccines have different immunogenicity in individual rhesus macaque associated with high MHC class II genes polymorphisms. And, finally, AV-1955 and AV-1959 DNA vaccines in mice, rabbits and rhesus macaques stimulating specific cellular immune responses to foreign Th-epitopes and not recognizing self T-cell epitopes of A β ₄₂ leading to the activation of autoreactive T-cells.

Nevertheless, it is clear that even the most immunogenic AD vaccine targeting pathological A β may not be therapeutic if vaccination is initiated in late stages of AD. The model of the major biomarkers of AD also indicates that A β pathology emerges many years prior to accumulation of tau pathology and even more years. However, modern advances in the development of diagnostic and prognostic diagnostic will allow to successfully implement this scheme of DNA vaccination by measuring biomarkers of AD followed by annual revaccination asymptomatic subjects as early as possible in order to not only effectively reduce brain A β -pathology, but also to inhibit tau pathology and preserve cognitive functions.